



TITLE:

男性不妊に関する研究 --in vitroに
おけるヒト精子acrosome reaction-

AUTHOR(S):

岡田, 弘

CITATION:

岡田, 弘. 男性不妊に関する研究 --in vitroにおけるヒト精子acrosome reaction--. 泌尿器科紀要 1985, 31(3): 429-440

ISSUE DATE:

1985-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/118438>

RIGHT:

男性不妊に関する研究

—*in vitro* におけるヒト精子 acrosome reaction—

神戸大学医学部泌尿器科学教室

岡 田 弘

STUDIES ON THE MALE INFERTILITY

—ACROSOME REACTION OF HUMAN SPERM INCUBATED *IN VITRO*—

Hiroshi OKADA

From the Department of Urology, Kobe University School of Medicine

In 1981, P. Talbot developed a triple-stain technique to estimate the number of human sperm undergoing normal acrosome reaction in fixed smears. In this method, live and dead sperm are first differentiated using the vital stain trypan blue. Sperm are then fixed in glutaraldehyde, dried onto slides, and the postacrosomal region and acrosome are differentiated using Bismark brown and Rose Bengal. Slides are examined at 1,000 \times with a bright-field microscope and assessed for the percentage of sperm that have undergone the normal acrosome reaction. Using this method we examined ① the time course of the acrosome reaction of human sperm incubated in mBWW ② the influence of human serum albumin, the calcium concentration of incubation media, Ca ionophore A23187, and trypsin on the acrosome reaction of human sperm and ③ the difference between the percentage of sperm undergoing normal acrosome reaction of fertile and infertile males.

We got the following results: ① The percentage of human sperm undergoing acrosome reaction increased for the first six hours of incubation, ② Without human serum albumin the acrosome reaction did not occur. Ca ion could be one of the triggers of the acrosome reaction. Ca ionophore A23187 and trypsin induced the acrosome reaction *in vitro*. ③ Sperm from oligozoospermic males, especially poorly motile sperm, could not undergo acrosome reaction so easily as sperm from fertile males could.

Key words: Male infertility, Oligozoospermia, Acrosome reaction, Ca ionophore A23187, Trypsin

緒 言

射出された精子は女性生殖器中を通過する間に capacitation を受け、授精能を獲得してゆく。そして、精子が卵の透明帯を通過し卵細胞内へ侵入、授精 (insemination) が成立するためには、精子頭部 acrosome の inner acrosome membrane に存在するタンパク分解酵素が放出されなければならない¹⁾。このタンパク分解酵素の放出には、前段階としての精

子頭部の plasma membrane および outer acrosome membrane の空胞変性が必要不可欠で、これによりはじめて acrosome の内容物である acrosin を含めた酵素作用の発現が可能となる。この一連の acrosome におこる変化を acrosome reaction (先体反応)と呼んでいる。ヒト精子頭部の大きさは5~7 μ とほかの実験動物のマウスやハムスターなどよりかなり小さいため、acrosome reaction の観察には透過型あるいは走査型電子顕微鏡が用いられてきた。し

かし、これらの方法は標本の作製に長時間を要し、電子顕微鏡を必要とするため、一般臨床の場ではルーチンに検査できなかった。著者は、光学顕微鏡を用いて acrosome reaction の観察可能な方法として、1981年に Talbot らによって報告された精子の triple-stain technique²⁾ を応用して、*in vitro* で培養したヒト精子の acrosome reaction について基礎的なものに臨床的検討を加えたので報告する。

I. 基礎的検討

研究方法、対象および結果

1. triple-stain technique

1) 実験材料

(1) 培養液

培養液として mBWW 液 (modified Biggers Whitten and Whittingham 液, Table. 1) を用いた。染色液を調整および洗浄精子を作製する際には human serum albumin (HSA) を除いた albumin free mBWW 液を用いた。

(2) 固定液と染色液

(a) 精子の固定液は透過型電子顕微鏡用資料作製に汎用されている 3% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.4 を用いた。

(b) 染色液は以下に示す 3 種類である。

(i) トリパンプルー染色液 Trypanblue を 2% w/v となるように albumin free mBWW で調整した。

(ii) ビスマルクブラウン染色液 Bismark brown を脱イオン水で 0.8% となるように調整し、HCl で pH を 2.0 とした。

(iii) ローズベンガル染色液 Rose Bengal を 0.1 M tris buffer pH 5.8 で 0.8% となるように調整した。

いずれの試薬も Sigma 社製を使用し実験当日に調整された。

2) triple-stain technique による洗浄精子の染色

(1) 第 1 染色 (トリパンプルー染色)

albumin free mBWW 液で 3 回洗浄した精子を albumin free mBWW 液で再懸濁し精子浮遊液を作製する。これに等量のトリパンプルー染色液を加え 37°C の water bath 中で正確に 15 分間染色する。これに albumin free mBWW 液を加え軽く攪はんした後、室温、250 g で遠沈し上澄を水流ポンプにて除き、沈澱に対して再度 albumin free mBWW 液を加え懸濁し、室温、250 g で遠沈した。この操作を上澄が淡青色になるまでつづけ上澄を除いた後、3% グルタ

Table 1. mBWW 液の組成¹⁾ (albumin free mBWW は HSA を含まない)

content	g/l
NaCl	4.910
KCl	0.356
CaCl ₂	0.189
KH ₂ PO ₄	0.162
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.294
NaHCO ₃	3.000
Na-pyruvate	0.028
Na-lactate	2.416
Glucose	1.000
Human serum albumin	35.000
Antibiotics stock soln	1.0mM
mOsmol	308

ルアルデヒド固定液を加え、0°C の氷室にて約 40 分間固定する。こうして固定された精子に脱イオン水を加え、室温、250 g で遠沈し、上澄を除いた後、再度脱イオン水中に懸濁した。この操作を 2 回繰り返すことにより固定液を除去した。この沈澱精子を、ごく少量の脱イオン水で懸濁し acid cleaned glass 上に均一に塗抹、そして水平位にて室温で一晩風乾し、第一染色精子の塗抹標本とした。

(2) 第 2 染色 (ビスマルクブラウン染色)

翌日、この精子塗抹標本を、40°C のビスマルク染色液中で正確に 5 分間染色し、ただちに脱イオン水中で十分に水洗し、余剰の水分を除く。

(3) 第 3 染色 (ローズベンガル染色)

上記標本を乾燥させないように注意してただちに、25°C のローズベンガル染色液中で 20~40 分間染色した。ついで、この染色標本を、脱イオン水中で十分に水洗した後、上昇エタノール系列で脱水、キシレンで透徹し、通常の病理組織標本と同様に、resin と cover glass によって封入し、永久標本作製した。

以上が triple-stain technique による精子染色法である。

3) triple-stain technique の原理

第 1 染色のトリパンプルー染色の目的は、生精子と死滅精子の染め分けである。すなわち、細胞膜の生物活性が保たれている生精子は染色されないが、生物活性の失われた死滅精子は頭部および尾部が青色に染色される。第 2、第 3 染色では、ビスマルクブラウンにより postacrosomal region が褐色に、ローズベ

ンガルにより acrosome がピンクに染め分けられる。plasma membrane および outer acrosome membrane がとれ inner acrosome membrane の露呈した acrosome reaction 陽性精子は acrosome が染色されない。

以上述べた triple-stain technique によって染め分けられる4種類の精子を模式的に示す (Fig. 1)。

① 生精子で acrosome reaction 陰性、すなわち精子頭部に acrosome を冠するものは acrosome がピンクに、postacrosome region が褐色に、tail はピンクに染まる。② 生精子で acrosome を失った、すなわち acrosome reaction 陽性精子の、acrosome は透明に抜けており postacrosome region は褐色に、tail は淡いピンクに染まる。そして死滅精子は、トリパンブルーによって全体が黒みがかって染色され、③死滅精子で acrosome を有するものは acrosome が赤褐色に、postacrosome region は黒褐色に、tail は黒色に染色される。④ 死滅精子で acrosome を失ったものの acrosome は透明に抜けており、postacrosome region は黒褐色に、tail は黒色に染色される。

実際の染色標本例が (Fig. 2) に示されている。

なお、acrosome reaction 陽性率は、観察精子数 (400~500) に対する acrosome reaction 陽性精子の割合を (%) にて表示した。すなわち acrosome

reaction 陽性率 (%) = acrosome reaction 陽性精子数/観察精子数×100

2. *in vitro* における洗浄精子 acrosome reaction の経時的变化

(対象)

過去1年以内に子供が生まれたか、または、その妻が妊娠中である fertile male のうちで varicocele testis が無く、精液中に *Ureaplasma urealyticum* が陰性の男子 (以下 Fertile Male とする) 5名から得た精子

(方法)

概略が (Fig. 3) に示されている。用手法にて精液を滅菌シャーレ中に採取し、室温 (25°C) で約30分間静置、充分液化させ、この一部を精液検査 (精液量、精子濃度、精子運動率、奇形率) に供した。このうち、albumin free mBWW を加え、室温、250 g で遠沈、上澄を水流ポンプにて吸引除去し、沈澱に再度 albumin free mBWW を加え懸濁、同様に遠沈、懸濁を3回繰り返して洗浄精子を作製した。こうしてできた洗浄精子を、パラフィンオイル下の mBWW の micro droplet 中に、精子濃度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ となるように加え、37°C、5% CO₂、95% air の CO₂ incubator 中で培養を開始した。一部の洗浄精子は、培養開始前の acrosome reaction の陽性率の算定に供された。培養開始後は、2時間目、4時間目、6時

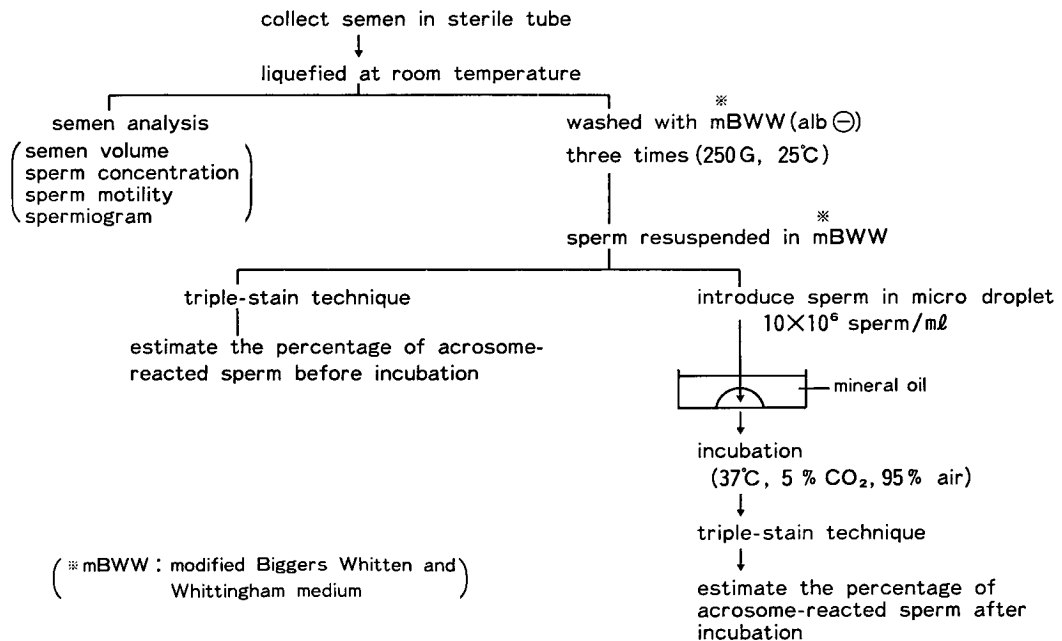


Fig. 3. 実験の概略

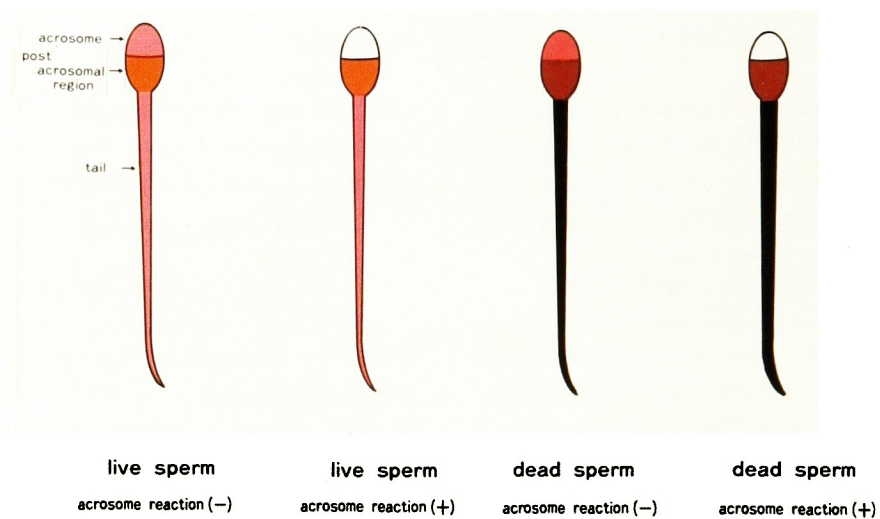


Fig. 1. triple-stain technique で染め分けられる 4 種類の精子

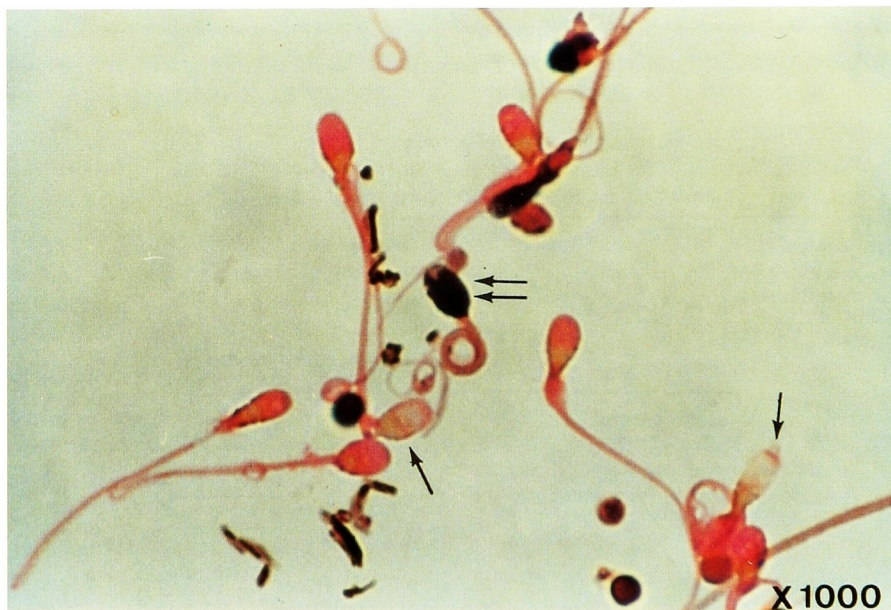


Fig. 2. triple-stain technique による実際の染色例

↑は acrosome reaction 陽性精子

↑↑は死滅精子 (×1,000)

間目, 8時間目, および12時間目に CO₂ incubator より一部検体を取り出し, これを triple-stain technique で染色し, 各時間ごとの acrosome reaction 陽性率とした. すべての実験は duplicate でおこなわれ, 精子濃度の測定は Makler の方法³⁾ により, 精子運動率の測定は神戸大学医学部泌尿器科学教室にて開発された B.P.P. 法⁴⁾ によった. varicocele testis の有無は, 触診および contact thermography⁵⁾ により, 精漿中 *Ureaplasma urealyticum* の有無はさきに報告した方法⁶⁾ により検索した.

(結果)

① acrosome reaction 陽性率は培養開始後6時間目まで漸増し, その後2時間平衡状態を保ち, 以後漸減していった.

② 培養開始時すでに, acrosome reaction 陽性精子が3%みられた (Fig. 4) が, これは洗浄操作な

どにより acrosome reaction が対象精子の3%に起こったことを示している.

3. *in vitro* における洗浄精子 acrosome reaction と培養液の albumin 濃度の関係.

(対象)

Fertile Male 3名の精子.

(方法)

albumin free mBWW と, Human Serum Albumin (HSA) を1.8%および, 3.5%となるように加えた mBWW でパラフィンオイル下に micro droplet を作製し, それぞれに, 洗浄精子を精子濃度が, $10 \times 10^6/\text{ml}$ となるように調整して加え, 37°C, 5% CO₂, 95% air 中で培養し, acrosome reaction 陽性率の経時的变化を観察した.

(結果)

① albumin free mBWW 中で培養した精子では

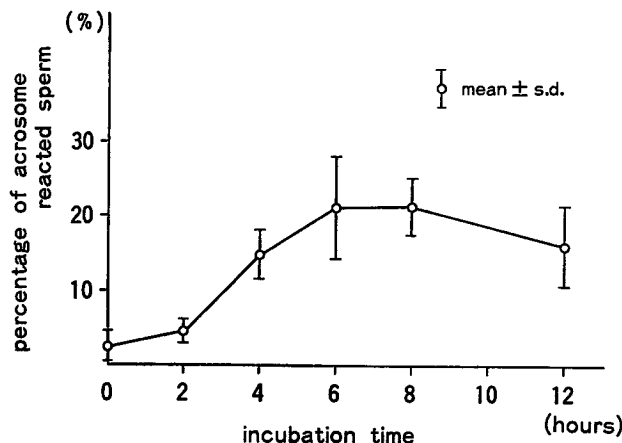


Fig. 4. *in vitro* mBWW で培養した洗浄精子の acrosome reaction の経時的变化

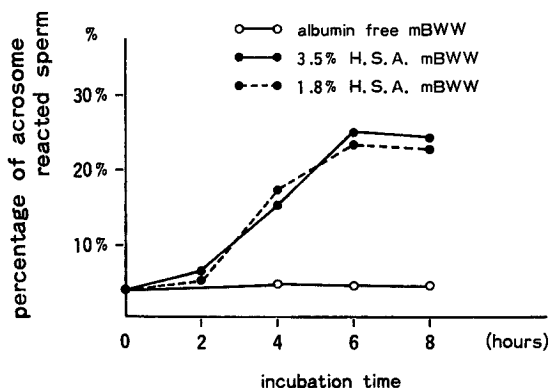


Fig. 5. albumin の acrosome reaction におよぼす影響について

acrosome reaction は起こらなかった。

② HSA 濃度 1.8% および 3.5% 間の acrosome reaction の陽性率に、有意差は認められなかった (Fig. 5)。有意差検定は paired t-test によった。

4. *in vitro* における洗浄精子 acrosome reaction に対する Ca イオンの影響。

(対象)

Fertile Male 4名の精子

(方法)

パラフィンオイル下の Ca free mBWW で作製した micro droplet 中に洗浄精子を $10 \times 10^6/\text{ml}$ となるように加え、4時間 preincubate した後、micro droplet 中に Ca イオンが最終濃度 $2 \mu\text{M}$ となるように添加し、その後の acrosome reaction の経時的変化を観察した。

(結果)

Ca イオン添加後、30分で acrosome reaction 陽性精子は Ca-free 群に比べ2倍に増加した (Fig. 6)。

5. *in vitro* における洗浄精子 acrosome reaction に対する Ca ionophore A 23187 の影響

(対象)

Fertile Male 3名の精子

(試薬)

Ca ionophore A 23187 (Eli Lilly 社製) を 100% ethanol で溶解し 10 mM の stock solution とし、これを mBWW で希釈し各種濃度の Ca ionophore A 23187 を含む培養液を作成した。

(方法)

パラフィンオイル下に mBWW で作成した micro droplet 中へ精子濃度が $20 \times 10^6/\text{ml}$ となるように、洗浄精子を加え、これに Ca ionophore A 23187 を最終濃度 $0.5 \mu\text{M}$, $1.0 \mu\text{M}$, $2.5 \mu\text{M}$, $5.0 \mu\text{M}$, および

$10 \mu\text{M}$ となるように添加し、30分、60分および90分後の acrosome reaction 陽性率を各濃度ごとに比較検討した。normal control は Ca ionophore A 23187 を加えず ethanol のみを最終濃度 0.1% となるように加えた mBWW とした。また、すべての実験操作は暗室中にて行なわれた。

(結果)

Ca ionophore A 23187 添加後 90 分の acrosome reaction 陽性率は高濃度となるほど高く、濃度依存性であった。また、 $10 \mu\text{M}$ 添加群の acrosome reaction 陽性率は normal control の約3倍であった (Fig. 7)。

6. *in vitro* における洗浄精子 acrosome reaction に対する trypsin の影響

(対象)

Fertile Male 5名の精子

(試薬)

trypsin は Sigma 社製を用いた。

(方法)

パラフィンオイル下に作製した mBWW の micro droplet 中に $10 \times 10^6/\text{ml}$ 精子濃度となるように調整して洗浄精子を加え、30分間 preincubate したのち、trypsin を 0.1%, 0.2%, 0.5% および 1.0% となるように添加し、その後の acrosome reaction 陽性率を各濃度ごとに比較検討した。

(結果)

trypsin は濃度依存性に acrosome reaction を誘発した (Fig. 8)。

II. 臨床的検討

研究方法、対象および結果

in vitro における培養前後の不妊患者精子の

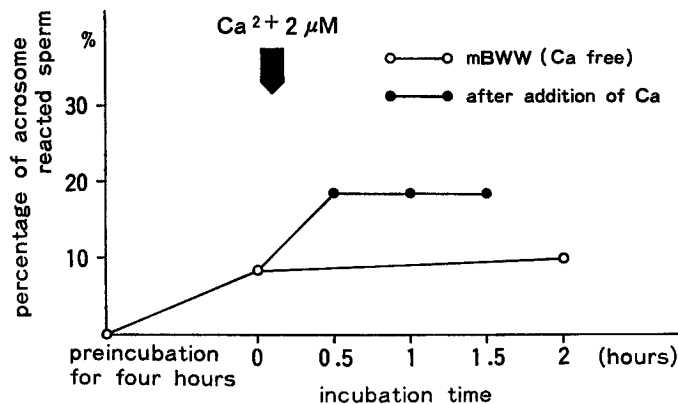


Fig. 6 Ca イオンの acrosome reaction におよぼす影響について

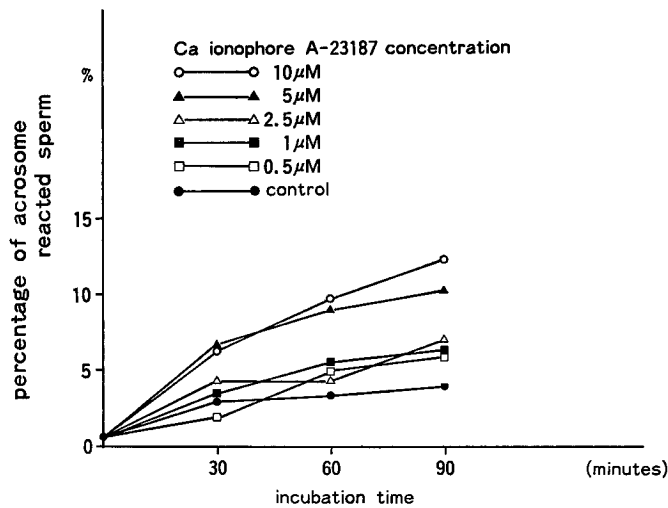


Fig. 7. Ca ionophore A23187 の acrosome reaction におよぼす影響について

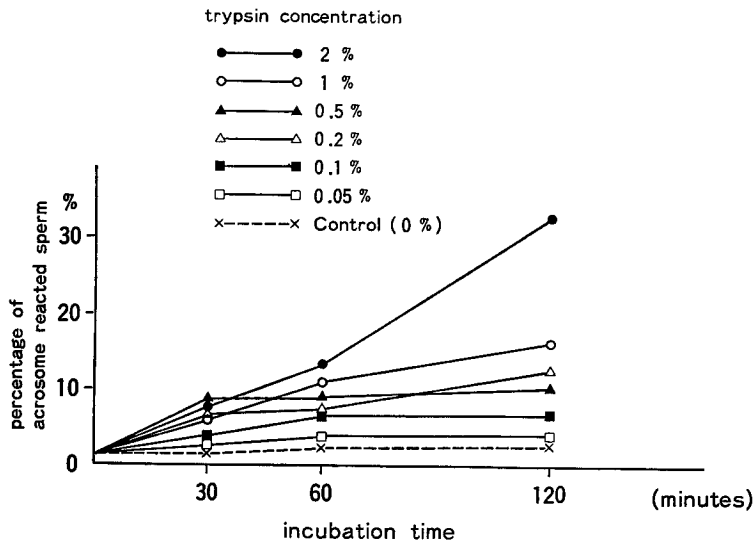


Fig. 8. trypsin の acrosome reaction におよぼす影響について

acrosome reaction 陽性率を精子濃度および精子運動率別に比較検討した。

(方法)

不妊患者洗浄精子をパラフィンオイル下の micro droplet 中にて、37°C, 5% CO₂, 95% room air の CO₂ incubator 内で培養し、培養前後に triple-stain をおこない acrosome reaction 陽性率を比較した。培養時間は予備実験 (Fig. 4) の結果を踏まえ 6 時間培養とした。

(対象)

対象は神戸大学医学部泌尿器科男子不妊外来通院患

者のうち以下に示す症例を除外した108例である。

azoospermia 症例, 精子濃度 $0.5 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の高度乏精子症例, motility が0%の精子無力症, 夫婦のいずれかに抗精子抗体が陽性であった症例, および妻に排卵障害, 卵管通過性障害を有するものを除外した。normal control として Fertile Male 5名の精子を採用した。

(結果)

対象とした108名を精子濃度別に以下のごとく4つの group に分けた。正常精子濃度群 (N群): 精子濃度 $45 \times 10^6/\text{ml}$ 以上, 乏精子症 grade 1 (oligo 1

群) : 精子濃度 $15 \times 10^6/\text{ml}$ 以上 $45 \times 10^6/\text{ml}$ 未満, 乏精子症 grade 2 (oligo 2 群) : 精子濃度 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 以上 $15 \times 10^6/\text{ml}$ 未満, 乏精子症 grade 3 (oligo 3 群) : 精子濃度 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 未満. なお, normal control の Fertile Male 5名をF群として記載した. 6時間培養後における各群の acrosome reaction の陽性率を比較すると (Fig. 9) 1. F群とN群との間に有意差はなかった. oligo 1 群, oligo 2 群および oligo 3 群の培養後の acrosome reaction 陽性率はF群に比して有意に低かった ($p < 0.05$). 2. N群の培養後の acrosome reaction 陽性率は oligo 1 群, oligo 2 群, oligo 3 群に比して有意に高かった ($p < 0.05$).

3. oligo 1 群の培養後の acrosome reaction 陽性率は oligo 2 群, oligo 3 群に比して有意に高かった ($p < 0.05$).

4. oligo 2 群と oligo 3 群との培養後の acrosome reaction 陽性率に有意差はなかった ($p < 0.05$).

この有意性検定は Wilcoxon rank sum test によった.

培養開始時の運動率別に対象症例を以下の4群に分け, それぞれの群間の6時間培養後の acrosome reaction 陽性率を比較した (Fig. 10).

group 1. 運動率20%未満の17例

group 2. 運動率20%以上40%未満の27例

group 3. 運動率40%以上60%未満の36例

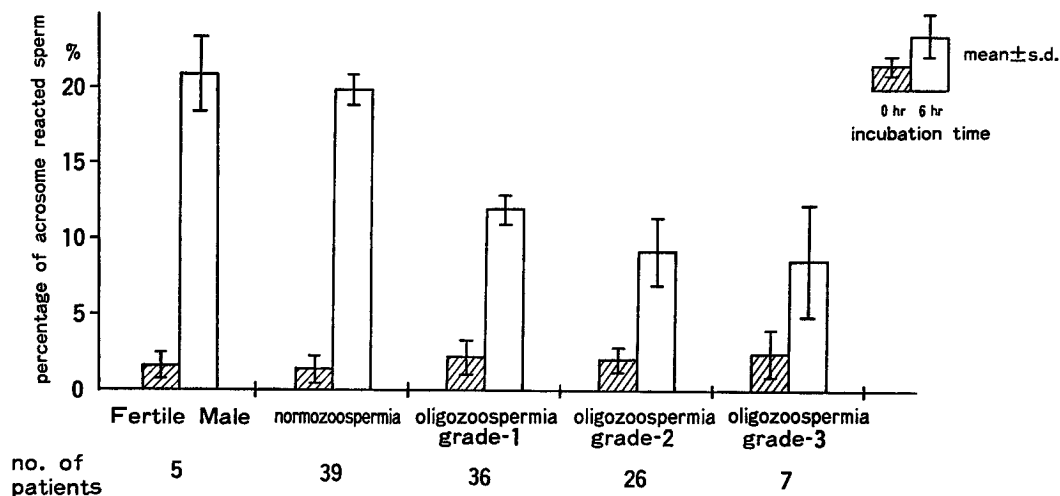


Fig. 9 精子濃度別にみた, fertile および infertile male 精子の acrosome reaction について

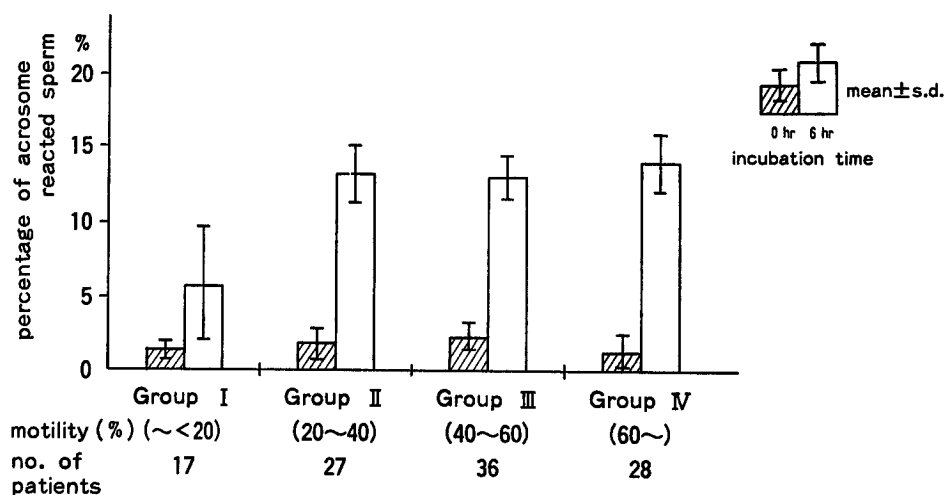


Fig. 10. 精子運動率別にみた infertile male 精子の acrosome reaction について

group 4. 運動率60%以上の28例

group 1. の6時間 培養後の acrosome reaction 陽性率はほかの3群に比して有意に低かった($p<0.05$). group 2. group 3. および group 4. の間には有意差はなかった (Wilcoxon rank sum test).

考 察

in vitro で、たとえば TMPA²⁾ や BWW 液³⁾ のような培養液中で哺乳類の精子に acrosome reaction を惹起させることは周知の事実であるが、この acrosome reaction に関する研究はおもに齧歯類のハムスターやモルモットなどの小動物を用いておこなわれてきた。これは、上記齧歯類の acrosome が位相差顕微鏡や微分干渉顕微鏡などの光学顕微鏡を用いて充分に観察可能との事情によっている。光学顕微鏡を用いたヒト精子の acrosome reaction の観察法としては、これまでに FITC-RCA を使った蛍光法⁹⁾ が報告されている。しかし、ヒト精子頭部は $5\sim7\mu\text{m}$ と小さいため光顕レベルでその膜の変化を充分にとらえることができなかった。このためおもに透過型または走査型電子顕微鏡を用いての研究がなされてきたが、これらは、観察に大規模の特殊な設備を必要とするものであり、定量的な解析をおこなうには長時間を必要とする。また、これらは acrosome membrane および plasma membrane に起こった変化を観察するものであるが、いずれも固定した精子を対象としているため、死滅精子の膜に非特異的に生じた死後変化 (acrosome membrane の脱落) を観察しているのか、真の acrosome reaction によって acrosome membrane および plasma membrane に変化を生じたものかの判別が困難であった。triple-stain technique は、これらの欠点を解決する方法で、トリパンブルー第1染色により生精子と死滅精子の染め分けが可能である。

実際の染色例に見ると、acrosome がピンクに染まったものと染まらなかったものは明瞭に区別される。第2染色に必要な時間は用いたローズベンガルの試薬ロットによって多少のばらつきがあったため、ロットごとに最適な染色時間を決定した。なお、今回の normal control は、varicocele testis を有する患者や精液中 *Ureaplasma urealyticum* 陽性患者の精子は形態学的に異常を有する割合が多いとの報告^{6,27)} があるため、これらを認めない Fertile Male 精子とした。

in vitro, mBWW 中で培養した精子の acrosome reaction 陽性率を経時的にみると (Fig. 4), 6時間

目までは漸増し8時間目まで平衡状態を保ち、以後漸減した。これは acrosome reaction をおこしている精子数は経時的に増加していくが、acrosome reaction 陽性精子は一般的に短時間で viability¹⁰⁾ が低下し、死滅していくため生精子数も経時的に減少してゆき、両者が6時間目で平衡に達したことによると推察される。また、培養開始時にも acrosome reaction 陽性精子が3%見られたのは、洗浄精子作成過程で、遠沈操作を3回行なっているため、物理的外力による acrosome membrane 脱落精子が存在するものと考えられる。

in vitro で培養した各種動物精子の acrosome reaction 陽性率は golden hamster¹¹⁾ の40%, guinea pig¹²⁾ の75%との成績に比べヒトでは20%と低率であった。*in vitro* で精子を培養し acrosome reaction をおこさせるためには albumin が必要不可欠であることが知られているが、いかなるメカニズムに albumin が関与するかはあきらかにされていない。著者の成績でも albumin free の培養液を使用した場合には acrosome reaction はおこらないが、1.8%および3.5%の albumin (H.S.A.) 濃度の培養液を用いた場合、acrosome reaction が両者とも同程度に誘発されていた。これは、Aitken ら¹³⁾ の3%および1.8%濃度の H.S.A. を用いた実験と同様の成績で、濃度依存性は見られなかった。しかし、最近同一製品、同一濃度の H.S.A. を使用しても、製品のロットにより acrosome reaction の誘発に差があるとの報告もみられ、これについて押尾ら¹⁴⁾ は、H.S.A. の fraction V は単一のタンパクのみではなく、数種類の夾雑物があり、これがばらつきの原因と説明している。また、彼はハムスター精子を用いた acrosome reaction の観察で、Bovine Serum Albumin (B.S.A.) の fraction V を精製したものを albumin として使用すれば、従来使用されている B.S.A. 濃度の 1/8 で、同程度の acrosome reaction の誘発が可能であったと報告¹⁵⁾ している。これは現在、世界各国で精子の授精能力評価に使用されている zona free hamster egg を利用した sperm penetration test (S.P.T.) の各施設間の差が albumin の精製度に起因するとのひとつの考えを示唆している。すなわち、S.P.T. の一段階としての acrosome reaction に質的、量的差があれば、結果として当然 sperm penetration に差が見られることになる。

Ca イオンを含まない培養液で洗浄精子を培養した場合には、acrosome reaction はおこらなかった (Fig. 6)。これは、albumin と同様に Ca イオンは

acrosome reaction 誘発に必要不可欠であるという諸家の報告¹⁶⁾と一致していた。4時間 Ca イオンを含まない培養液で洗浄精子を preincubate した後、Ca イオンを添加すると短時間に acrosome reaction が誘発された。これは、albumin や Ca イオン添加によって、acrosome reaction を同期化¹⁷⁾しうることを示しており、精子授精能獲得の一段階であるこの acrosome reaction を同期化することは、各精子間の授精能獲得過程の差がなくなり zona free hamster egg を用いた精子授精能評価成績¹⁸⁾をさらに安定させるものと期待される。Ca ionophore A 23187 は Ca イオン存在下に、ウシ¹⁹⁾、ヒツジ²⁰⁾、ウサギ、モルモット²⁰⁾やヒト精子²¹⁾に acrosome reaction を誘発させる。今回の成績 (Fig. 7) では、Ca ionophore A 23187 は 0.5 μ M~10 μ M の範囲で濃度依存性に、acrosome reaction を誘発した。guinea pig や boar の精子の場合は Ca ionophore A 23187 と Ca 存在下ではすぐに運動率が低下してしまうがヒト精子は運動率が低下することはなかった。この原因は、Ressel ら²²⁾によれば guinea pig や boar の精子は好気的な代謝をしており、Ca ionophore A 23187 でミトコンドリア内への Ca イオンの流入が増加し O₂ 消費が増加し結果として O₂ 欠乏に陥り、運動性が低下するがヒト精子は好気的、嫌気的な環境のいずれでも生存可能なためと報告されている。Ca ionophore A 23187 は、生体膜に変化をおこし、Ca の influx を増加させることが知られている。Jamil²³⁾の電子顕微鏡による精子膜に対する観察によれば、Ca ionophore A 23187 は精子頭部の equatorial segment から前方の plasma membrane と outer acrosome membrane に vesiculation をおこさせると報告している。この膜におこった変化は、生理的条件下で acrosome reaction をおこした精子膜の変化に近似している。Ca ionophore A 23187 がいかなるメカニズムによって精子の膜に上記のような変化をきたすかは、あきらかではないが、Ca ionophore A 23187 が phospholipase A₂ の強力な stimulator²⁴⁾であることを考えれば、精子膜に存在する phospholipase を介して acrosome reaction を誘発している可能性があると考えられた。

さまざまなタンパク分解酵素によって acrosome reaction を誘発させる試みがなされているが、trypsin は 0.05 %~2 % の範囲で濃度依存性にヒト精子 acrosome reaction を誘発した (Fig. 8)。また、2 % trypsin 添加により、通常の培養条件下ではほとんど acrosome reaction がおこらないとされている

培養開始後 120 分という短時間に、32 % の精子が acrosome reaction をおこした。これは、trypsin にも acrosome reaction の誘発作用であることを示している。Perreault ら²⁵⁾は guinea pig 精子の acrosome reaction にたいする trypsin inhibitor の影響を観察し、trypsin は直接精子膜に作用しており、acrosin には関与しないと述べている。

不妊患者精子と fertile male 精子を *in vitro* で培養した際の acrosome reaction 陽性率を比較したところ、F 群は N 群との間に有意差がなかった。このことは、N 群の精子は F 群の精子と同様に acrosome reaction を正常におこすが、妊娠にいたるそのほかのステップである、精子の子宮頸管粘液の通過性、精子の卵への侵入性、授精卵の着床障害あるいはなんらかの婦人側因子などが不妊の原因になっているものと、考えられる。

乏精子症の 3 群の acrosome reaction 陽性率がいずれも F 群より低かったことは、acrosome reaction の障害された乏精子症症例の存在を示唆している。

不妊患者精子の *in vitro* における acrosome reaction 陽性率を、運動率別に検討すると (Fig. 10)、培養開始時の運動率が 20 % 未満の症例の群は、20 % 以上の症例の群より 6 時間培養後の acrosome reaction 陽性率は有意に低かった。これは、培養開始時の運動率が低い精子は、培養という環境に弱い精子が多く、*in vitro* で acrosome reaction をおこさせることもそのものが困難であることを示している。

Edwards ら²⁶⁾が、IVF+ET (*in vitro* fertilization+embryo transfer) による挙児の第 1 例目の成功例を 1978 年に報告して以来、ヨーロッパ各国やオーストラリア、アメリカの諸施設で実施され、最近わが国においても数施設でおこなわれている。IVF+ET にさいし、培養開始時の運動性の悪い精子は、その実施が困難とされているが、前述の運動率と acrosome reaction に関する結果が、この原因のひとつを説明している。

IVF+ET をおこなうにあたり、事前に *in vitro* で培養した精子の acrosome reaction を triple-stain technique によりチェックすることは、その適応を決めるうえで、また成功率を向上させるためにも意味のあるところと考えられる。

以上、triple-stain technique は特別な設備を要せず、比較的短時間で acrosome reaction の観察が可能であることより、不妊の精子側因子のスクリーニングのひとつとして、きわめて有用と考えられた。

結 語

triple-stain technique を用いてヒト精子 acrosome reaction を観察した結果、

1. mBWW 中では培養開始後6時間目までは acrosome reaction 陽性精子の割合は漸増した。

2. human serum albumin を含まない培養液中では acrosome reaction はおこらなかった。Ca イオン, Ca ionophore A23187, trypsin には acrosome reaction の誘発作用が認められた。

3. 不妊患者精子のうちで乏精子症患者の精子や運動率が20%以下の精子は Fertile Male の精子に比して acrosome reaction をおこさせることが困難であった。このことが不妊症の一因となっている可能性が示された。

稿を終えるにあたり、終始御指導ならびに御校閲を賜りました恩師石神襄次教授に深甚なる感謝の意を表します。

また本研究に際し直接御指導いただきました守殿貞夫助教授に感謝するとともに御協力をいただいた教室の諸先生方に深く感謝いたします。

本論文の要旨は第27回日本不妊学会総会（1982年）、第71回日本泌尿器科学会総会（1983年）および第2回日本アンドロロジー学会シンポジウム（1983年）にて報告した。

文 献

- 1) Zahler WL and Deak GA: Isolation of outer acrosome membrane from bull sperm. *Biochim Biophys Acta* 406: 479~488, 1975
- 2) Talbot P and Chacon RS: A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J Exp Zool* 215: 201~208, 1981
- 3) Makler A: The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil Steril* 33: 337~338, 1980
- 4) Hazama M, Okada H, Matsumoto O, Kamidono S and Ishigami J: Automatic analysis of sperm characteristics by means of a microcomputer system. *The Male Factor in Human Infertility*. MTP Press Limited, Lancaster. Chapter 2: 9~11, 1984
- 5) Ridel P and Stackl W: Contact thermography in the diagnosis of varicocele. *Varicocele and male infertility* Eds. E.W. Jecht and E. Zeitler, 73~77, Springer-Verlag,

Berlin Hiedelberg New York, 1982

- 6) 岡田 弘・岡 伸俊・川端 岳・浜口毅樹・荒川 創一・羽間 稔・松本 修・片岡陳正・守殿貞夫・石神襄次: *Ureaplasma urealyticum* と精子に関する研究—化学療法前・後における精子形態の比較—*泌尿紀要* 30: 1433~1438, 1984
- 7) Barros C, Gonzalez J, Herrera E and Bustos-Obregon E: Human sperm penetration into zona free hamster oocytes as a test to evaluate sperm fertilizing ability. *Andrologia* 11: 197~210, 1979
- 8) Yanagimachi R: Sperm-egg association in mammals. In *current topics in developmental biology*. A.A. Moscona and Alberto Monroy, eds. Vol 12: 83~105, 1978
- 9) Talbot P and Chacon PS: A new procedure for rapidly scoring acrosome reactions of human sperm. *Gamete Research* 3: 211~216, 1980
- 10) Green DLP: The induction of the acrosome reaction in guinea pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. *J Cell Sci* 32: 137~151, 1978
- 11) Meizel S and Working PK: Further evidence suggesting the hormonal stimulation of hamster sperm acrosome reactions by catecholamines in vitro. *Biol Reprod* 22: 211~216, 1980
- 12) Singh J, Babcock DF and Lardy HA: Induction of accelerated acrosome reaction in guinea pig sperm. *Biol Reprod* 22: 566~570, 1980
- 13) Aitken RJ, Wang F-Y, Best JLF and Richardson DW: The influence of medium composition, osmolarity and albumin content on the acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa: development of an improved zona-free egg penetration test. *Int J Andrology* 6: 180~193, 1983
- 14) 押尾 茂・毛利秀雄・柳町隆造: ハムスター精子のアクロゾームリアクションに及ぼす高純度BSAの影響. 第2回日本アンドロロジー学会ワークショップ. 1983
- 15) 押尾 茂・毛利秀雄: 精子研究の現況. 受精着床 83: 197~200, 学会出版センター

- 16) Yanagimachi R and Usui N : Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp Cell Res* 89: 161~174, 1974
- 17) 斉藤 晃・星 和彦・鈴木雅洲・林 恵子・柳町隆造: ヒト精子の受精能獲得時間の個人差. 日本不妊学会雑誌 29: 90~96, 1984
- 18) 入谷 明: 精子の雌性器内移送と受精能獲得. 代謝. Vol. 16. 臨時増刊号「性」. 299~306, 1979
- 19) Peterson RN, Russell L, Bundman D and Freund M: Presence of microfilaments and tubular structures in boar spermatozoa after chemically inducing the acrosome reaction. *Biol Reprod* 19: 459~466, 1978
- 20) Summers RG, Talbot P, Koeough EM, Hylander BL and Franklin LE: Ionophore A 23187 induces acrosome reaction in sea urchin and guinea pig spermatozoa. *J Exp Zool* 198: 383~392, 1976
- 21) Jamil K and White IG: Induction of acrosomal reaction in sperm with ionophore A 23187 and calcium. *Arch Andrology* 7: 283~292, 1981
- 22) Russell L, Peterson RN and Freund M: Morphologic characteristics of the chemically induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil and Steril* 32: 87~92, 1979
- 23) Jamil K, White IG and Dware DM: Calcium ionophore A23187 as a probe for freeze-fracture studies of membrane changes in the head of human spermatozoa. *Ach Andrology* 8: 1~9, 1982
- 24) 室田誠逸: ホスホリパーゼ反応の制御: プロスタグランディンの生化学—基礎と実験—東京化学同人 30~34, 1982
- 25) Perreault SD, Zirkin BR and Rogers BJ: Effect of trypsin inhibitors on acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *Biol Reprod* 26: 343~351, 1982
- 26) Steptoe PC and Edwards RG: Birth after the reimplantaion of a human embryo. *Lancet* 2: 336, 1978
- 27) Zorngiotti AW ant MacLeod J: Studies in temperature, human semen quality, and varicocele. *Fertil and Steril* 24: 854~863, 1973

(1984年10月19日迅速掲載受付)